



#13
5-6-00
PATENT
3519-0103P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Qingbin DONG et al. Conf.: 1384
Appl. No.: 09/695,053 Group: 1614
Filed: October 25, 2000 Examiner: HENLEY III, R
For: A METHOD OF ANALGESIA

LETTER RECEIVED

APR 23 2002

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

April 22, 2002
TECH CENTER 1600/2900

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
CHINA	00 1 24517.1	September 18, 2000

OK to Enter

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By Mark J. Nuell
Mark J. Nuell, #36,623

DRN/crt
3519-0103P

P.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000

Attachment

02.02



09/695,053
October 25, 2000
Qingbin Dong et al.
3519-0103P

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

日： 2000 09 18

号： 00 1 24517.1

别： 发明专利

名称： 全身给药的镇痛方法

人： 威克斯医疗仪器有限公司

设计人： 董庆滨； 沈希光

RECEIVED
APR 23 2002
TECH CENTER 1600/2900

BEST AVAILABLE COPY

中华人民共和国
国家知识产权局局长

姜颖

2000 年 10 月 25 日



权 利 要 求 书

1. 一种针对哺乳动物的疼痛的经全身给药的镇痛方法，包括向所述的哺乳动物，重复全身给予有效剂量的纯度为 96% 以上的河豚毒素或蛤蚌毒素，及其类似物。
2. 如权利要求 1 的方法，其中，所述河豚毒素及其类似物是指分子式为 $C_{11}H_{17}N_3O_8$ 的氨基喹唑啉化合物及其衍生物，包括但不限于去水河豚毒素，胺基河豚毒素，甲氧基河豚毒素，乙氧基河豚毒素，脱氧河豚毒素及河豚酸。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述全身给药是指肌肉注射、皮下注射、静脉注射、口服、舌下含服、皮肤贴敷、渗透泵植入、胶原、喷雾剂或肛门栓剂。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述疼痛为机械、化学、或缺血的刺激或者发炎而导致。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述疼痛为神经损伤性疼痛。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述疼痛为癌症疼痛。
7. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述河豚毒素或和蛤蚌毒素，及其类似物的给药剂量范围为每公斤体重 0.1 到 5 μg 。
8. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的重复给药是指在疗程内每日给药一次或一次以上。
9. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述哺乳动物包括但不限于生育年龄的雌性。
10. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述河豚毒素并不会产生不可逆转的副作用。
11. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述河豚毒素并不会在给药部位产生局部肌肉刺激。
12. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述河豚毒素并不会在所述哺乳动物体内诱发全身过敏性反应。
13. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述河豚毒素并不会在所述哺乳动物体内诱发溶血现象或血管刺激。
14. 如权利要求 8 所述的方法，其中，所述的重复给药是指在疗程内每日可以每 3 到 12 小时给药一次。
15. 如权利要求 14 所述的方法，其中，所述疗程为 1 到 10 天，首选是 3 天，并可以重复 1 次或以上。
16. 如权利要求 17 所述的方法，其中，所述注射制剂包括一种河豚毒素的醋酸溶液。
17. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的蛤蚌毒素，是指分子式为 $C_{10}H_{17}N_7O_4 \cdot 2\text{HCl}$ 的化合物及其衍生物。
18. 如权利要求 6 所述的方法，其中，所述疼痛是由以下癌症中的一种产生：肝癌，直肠癌，血癌、骨癌、淋巴瘤、食道癌、生殖器癌、前列腺癌、消化道癌、胃癌、结肠癌、乳房癌、呼吸道癌、肺癌、支气管癌、泌尿系统癌、淋巴瘤和皮肤癌。

说明书

全身给药的镇痛方法

本发明涉及利用河豚毒素及蛤蚌毒素一类的钠离子通道阻断剂全身给药方式的镇痛方法，适应症包括但不限于癌症疼痛，可以应用于机械、化学、或缺血的刺激或者发炎而导致的疼痛，以及神经损伤性疼痛。

疼痛是一种患者自觉受到伤害的感觉。疼痛是与发炎，缺血，机械或其它刺激所致的实际或潜在的损伤以及组织受损相关连的。它可以是急性的或者慢性的，而且除了病人自己，第三者是无法给于准确贴切的描述或界定的。

相对于不同强度的疼痛，世界卫生组织推荐三级阶梯止痛方法如下：

1. 使用非鸦片类的镇痛药，例如非类固醇的消炎镇痛药（NSAIDS）可以使用或者不使用协同镇痛药；
2. 如果疼痛持续或增加到中等强度，可以使用低效力的鸦片类镇痛药，同时可以使用协同镇痛药；
3. 如果疼痛仍持续或增加到高强度，可以使用低效力的鸦片类镇痛药，同时可以使用或者不使用非鸦片类的协同镇痛药。

可以看出，对中度到重度疼痛目前常用鸦片类镇痛药。但是医疗界向来对使用此类镇痛药有所争议，因为它们是具有药物成瘾性的。

癌痛是众所周知的一种非常常见的临床症状，癌痛不仅严重地影响癌症病人的生活和情绪，也对其家人带来严重的心理负担。传统的治疗方法是按WHO 三级阶梯止痛方法，对中、重度癌痛病人使用阿片类药物，同时可配合应用镇痛辅助药，如安眠、镇静剂以增强镇痛药的疗效。这种传统的方法虽然能达到镇痛目的，但其缺点十分突出，其主要缺点是容易使病人产生耐药性，使镇痛时间缩短，用药剂量逐渐加大，长期使用，使机体产生药物依赖性，导致病人遭受药物依赖的痛苦。很多病人还因担心产生阿片类药物依赖，不愿使用阿片类药物，使其病痛无法缓解，更有很多癌痛病人因使用阿片类药物，对治愈癌痛失去信心，用大量阿片类药物麻醉自己，而导致阿片类药物中毒死亡。

在临床工作中如何寻到一种更新更好，即能有效镇痛特别是长效镇痛又不产生药物耐受和药物依赖性的新型镇痛药就成为现代医务工作者的重要任务之一，这也是从根本上提高癌痛和其它疼痛病人生活质量的需要。

作为现有技术，曾有报道用钠通道阻断剂例如利多卡因、卡马西平，在低于阻断神经传导的浓度时即可消除外周神经损伤的异常电活性，并在临床上成功地消除神经病痛和三叉神经痛（Charel 等，1989；Densos 等，1992；Sotsin 等，1992、1994）。然而之后的报道（竺心影，1996），卡马西平对肝功能有严重损害，妊娠初期及哺乳期妇女禁用；青光眼、严重心血管病症和老年人要谨慎使用。利多卡因对中枢神经系统有兴奋作用，易出现震颤、寒战、阵发性惊厥，因此，我们认为这两种药物很难作为一种新型镇痛药在临床推广使用，只能做为工具药使用。该报道仅仅初步表明钠离子阻断剂与镇痛有一定关系，钠通道阻断剂可能成为开发新型镇痛药物的发展方向。但是要真正在有效长期镇痛上取得突破，还得密切留意镇痛机理上的不断进展。

为此我们注意到 Rabert 等在 1998 年的报道，大鼠背根神经节（DRG）有两种 TTX 的钠通道：一种是 TTX 敏感通道（TTX-S）TTX 阻断其开放的 IC_{50} 为 $1-20 \mu M$ ；另一种是 TTX 非常不敏感通道（TTX-R）TTX 阻断其开放 IC_{50} 为 $100 \mu M$ 左右。人 DRG 感觉神经元有 TTX-S 为 hPN_1 ，TTX-R 为 hPN_3 ，TTX 阻断 hPN_3 开放的 IC_{50} 为

80 μM 左右。Rabert 用电生理学方法检测哺乳动物钠通道有两种类型钠电流：一种是 TTX-S 快速失活的敏感钠电流 (TTX-SINa) 一种是 TTX-R 缓慢失活的不敏感钠电流 (TTX-RINa) 因此疼痛状态下痛感受器的敏感化是通过 TTX-R 的 Na^+ 通道介导的，也就是在疼痛条件下 (Gold, 1996) 增痛剂在使痛感受器敏感性增强的同时，也增加 TTX-R 通道的活性。

(Zapata, 1997) 用 TTX 100—300 μg 进行的离体大鼠 DRG 一次性使用的结果，ENA 受抑制的时间仅为 10 分钟以上。此时，仅 TTX-S 与 TTX 发生生理药理效应而没有 TTX-R 参与。因此这个过程中只有 TTX-SINa 参与，没有 TTX-RINa 参与，所以，这个镇痛过程肯定是非常短暂的。

在离体的条件下，其结果仅是一条 DRG 或 DH 本身的钠通道变化，在这种条件下，只有 TTX-S 能与 TTX 发生生理药理反应，TTX-SINa 引起的变化是很短暂的 (约 10 分钟以上) 在这类反应中没有增痛剂活化 TTX-R，所以没有观察到 TTX-R 对镇痛的贡献。现在根据我们动物研究和临床治疗癌痛病例的观察结果分析发现，在使用 TTX 60 $\mu\text{g}/\text{天}$ ，连续用药三天，累计用药量为 180 $\mu\text{g}/3\text{d}$ ，停药后，产生连续长效镇痛的治疗效果是由于在这个 TTX 用药量和 3 天的疗程内，TTX 不仅与 TTX-S 发生生理药理效应，而且与活化的 TTX-R 充分地发生生理药理效应，具体地说，可以认为在癌痛条件下，致痛因素在使痛感受器敏感性增加的同时，也增加了 TTX-R 的活性，从而使 TTX-R 对 TTX 更敏感，TTX 180 $\mu\text{g}/3\text{d}$ 使 TTX-R 发生更有利于抑制痛感受器敏感性的变化，主要是使 TTX-R 的 Hpn_3 阻断增加，TTX-RINa 也长期减少，从而抑制了痛感受器的敏感性。使之不感受病变部位产生的疼痛刺激，最终发挥长期镇痛的作用，而且 TTX-R 受致痛因素的作用活化后，对 TTX 的反复刺激不产生耐受性和药物依赖性，因此在动物 (小鼠、大鼠、猴) 的研究和癌痛病人的临床治疗均未出现药物耐受和药物依赖现象。

注：

致痛因素：增痛剂 (前列腺素 E_2 、腺苷、5-羟色胺)

TTX-RINa：缓慢失活的 TTX 敏感电流

TTX-R：对 TTX 非常不敏感的钠离子通道

TTX-R 开放的 IC_{50} ：为对 TTX 非常不敏感的钠离子通道面积

TTX-S：对 TTX 敏感的钠通道

TTX-SINa：快速失活的 TTX 敏感电流

“+” 兴奋作用

“-” 抑制作用

鉴于上述的事实，我们做出了本发明。通过全身给药的方式，我们选用的钠离子通道阻断剂河豚毒素的制剂可以有效地缓解多种物理化学原因造成的疼痛，包括顽固而严重的癌症疼痛，而且疗效持续时间可以达到 15-30 天，大大超过目前最好的鸦片类镇痛药，却又不会使病人产生药物依赖或成瘾。临床观察表明，我们发明的方法对多种癌症都有确实的疗效。

河豚毒素可以对急性或慢性疼痛都产生治疗作用。动物试验表明，河豚毒素对各种刺激尤其是化学刺激引发的急性疼痛的镇痛作用能够大大超过阿斯匹灵、吗啡、哌替啶等临床常用的镇痛药。

在急性毒性、慢性毒性、生殖毒性、遗传变异毒性、局部毒性、一般药理、药物过敏性以及药物依赖性等大量的试验中发现，本发明剂量范围内对河豚毒素的使用是安

全的，不会产生明显的或者是不可逆转的毒副作用。

本发明的方法包括向感受的疼痛的哺乳动物，配合医药上适当的载体溶液，利用肌肉注射等方式全身给予有效剂量的钠离子通道阻断剂，从而缓解疼痛。对人的剂量的范围在每公斤体重 0.1-5 μ g/kg。一个疗程包括在三天时间内每天给药不多于 4 次。疗效常常可以持续到 20 天。

所用河豚毒素的浓度为 96%或者更高。

上述的动物实验和临床研究均证明了该项研究结果完全不同于此前有关 TTX 的所有镇痛试验，其主要不同点：

- 1、已往的 TTX 镇痛动物研究均为一次性用药。
- 2、已往的 TTX 镇痛的人体研究均为一次性局部用药。
- 3、已往的 TTX 镇痛研究均为局部短时镇痛（均不超过 24 小时）
- 4、已往的研究 TTX 对人镇痛多为粘膜、角膜或浅部神经痛。
- 5、本项专利是反复使用 TTX 肌注对人进行长期镇痛。
- 6、本项专利中 TTX 对大鼠、猴和人的镇痛特点是疗程短，镇痛时间长（15~30 天）
- 7、本项专利是 TTX 对人的机体内部深处脏器疼痛和癌痛进行长期镇痛治疗。
- 8、用 TTX 治疗长期病痛（包括但不限于恶性或良性肿瘤）对其他感觉（触、视、听觉）无影响，保持意识清醒的状态下，达到机体不感觉疼痛的治疗作用。
- 9、TTX 治疗长期病痛（包括但不限于恶性或良性肿瘤）均在机体处于清醒无麻醉的条件下，发挥其长效镇痛的治疗效果，与用麻醉镇痛有本质区别。
- 10、TTX 在治疗各种疼痛的剂量范围内无特殊的明显副作用。
- 11、本项专利涉及 TTX 反复使用不产生药物耐受和药物依赖。

实施例 1 制剂

河豚毒素纯品由广西南宁枫叶药业有限公司生产，其纯度按以下方法测定：

仪器及试剂：

仪器：美国 Beckman 高效液相色谱仪（包括 125 泵，166 可变波长检测器，Gold Nouveau 色谱工作站）

药品：替曲朵辛由本公司精制，其对照品由本公司提供。

试剂：庚烷磺酸钠，日本东京化成工业株式会社；甲醇，Merck 公司；水：去离子水。

色谱条件：

色谱柱：ODS（5 μ m）4.6mm \times 250mm

柱温：30 $^{\circ}$ C；

流动相：0.01mol/L 庚烷磺酸钠（pH5.30）—甲醇（100：1）

流速：1.5 ml/min

检测波长：205 nm

操作方法：

精密量取替曲朵辛约 10mg，置于 25ml 容量瓶中，加 0.02%的醋酸溶液溶解并稀释至刻度，摇匀。取样品溶液 20 μ l 注入 HPLC 仪，记录色谱图，测定峰面积。

结果：

南宁枫叶药业有限公司生产的三批河豚毒素的纯度分别测定为 99.38%, 98.66% 和 99.11%。该公司所生产的河豚毒素的纯度按绝对法可以达到 97.5%以上,按相对法则可以达到 98%以上。

在以下实施例 2 中使用的河豚毒素制剂是注射液,规格为 2ml:30 μ g。处方如下:

替曲朵辛	15mg
0.5%稀醋酸	1ml
醋酸-醋酸钠缓冲液(PH=3.5)	50ml(所配药液总体积的 5%)
注射用水 加至	1000ml

根据临床前药理药效实验研究结果推算替曲朵辛注射液的制剂含量。

i) 按对动物的有效剂量推算临床用药剂量:一般按对动物有效剂量的 1/5 计算,人的体重分别以 50、60、70kg 计。

● 本品对小鼠醋酸扭体的镇痛 ID_{50} (半数抑制量)为 2.80 μ g/kg(im) 则人的临床推荐用药剂量为:

$$2.80 \mu\text{g/kg} \times 1/5 \times 50(60, 70) \text{kg} = 28.0(33.6, 39.2) \mu\text{g}$$

● 本品对大鼠甲醛致痛的镇痛有效剂量为 2.5 μ g/kg(im) ($P < 0.01$) 则人的临床推荐用药剂量为:

$$2.50 \mu\text{g/kg} \times 1/5 \times 50(60, 70) \text{kg} = 25.0(30.0, 35.0) \mu\text{g}$$

ii) 按 LD_{50} 值推算临床用药的初步剂量:结合药效学研究结果,按 LD_{50} 的 1/50 计算临床药用剂量,人的体重分别按 50、60、70kg 计。

● 本品小鼠 LD_{50} 为 19.394 μ g/kg(im) 故临床推荐用药剂量为:

$$19.394 \mu\text{g/kg} \times 1/50 \times 50(60, 70) \text{kg} = 19.39(23.27, 27.15) \mu\text{g}$$

iii) 文献报导,按日本针剂规定用相当于每公斤小鼠最低死亡剂量(为 10 μ g/kg) 的 1/14 的 50 倍(一般人体重量以 50kg 计)的替曲朵辛溶于 0.5%的石炭酸水溶液 1ml 作为一次注射量(亦即相当于人的死亡剂量的 1/14) 据此推算,每只安瓿中含替曲朵辛 35.7 μ g。

根据药理药效学研究结果并参考有关文献资料,将替曲朵辛注射液的规定为: 2ml:30 μ g

实施例 2 临床研究

在一项临床研究中,初步观察了替曲朵辛注射液对 11 位癌症晚期病人癌性疼痛的治疗作用。

1、临床资料

1.1 病例选择:本组受试病人共 11 例,均经 CT.病理确诊为晚期恶性肿瘤患者,按 WHO 标准 VAS 线段分级法,确认为均伴有中度以上疼痛,男 6 例,女 5 例,年龄最大者 76 岁,最小者 26 岁,肝癌晚期 5 例,平滑肌肉瘤术后复发伴肝转移 1 例,胃癌术后复发 2 例,食道癌术后复发 1 例,直肠癌术后复发 1 例,结肠癌肝转移 1 例。受试者均自愿接受本项临床研究。

1.2 药物与用法:

1.2.1 替曲朵辛注射液[Tetrodin] 30 μ g/2ml/支。

批号: 990122 为南宁枫叶药业有限公司生产。

1.2.2 用法:替曲朵辛注射液 30 μ g/支,1 次/12h 肌注,连用三天(共用 6 支药)后即停药。

1.3 观察方法：

按徐国柱教授设计的替曲朵辛注射液临床研究计划及研究方案进行，本组受试者均采取无对照开放试验方法。

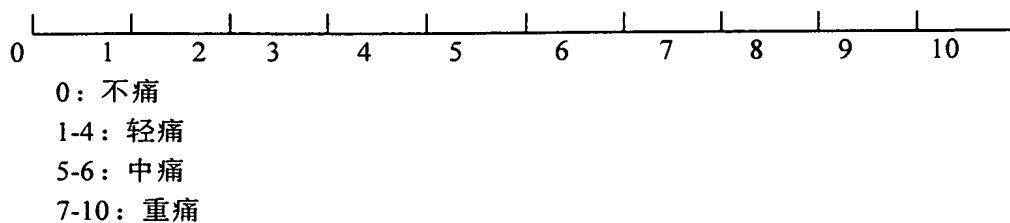
1.4 疗效评定：

按徐国柱、蔡志基教授在“镇痛药临床评价方法研究”一文中介绍的方法进行。

2、疼痛强度分级和记录方法

受试者在接受本项临床观察治疗前 24 小时及使用本药后在观察记录时间内不使用其它镇痛药，否则退出本项研究。每次于用药前均须在 VAS 线段上由受试者标记出自己的疼痛级别。每次用药后分别在 0.08h(5')、0.17h(10')、0.25h(15')、0.33h(20')、0.5h(30')、1h、2h、3h、4h、5h、6h、7h、8h、12h 共 14 个记录时间观察记录受试者的疼痛强度。

2.1 疼痛强度记录方法：采用 WHO 标准 VAS 线段法。



3、镇痛效果的判定

3.1 疼痛强度差(**Pain intensity difference, PID**)即患者服药前疼痛强度与服药后每次测定的疼痛强度之差值。

3.2 总疼痛强度差(**Sum of pain intensity difference, SPID**)当日每次的 PID 除以相应观察时间之值的总和即为当天的 SPID。

3.3 疼痛缓解度(**Pain relief, PAR**)经询问患者，由医生做出如下判断：0 度：未缓解；I 度：轻度缓解(疼痛减轻约 25%)；II 度：中度缓解(疼痛减轻约 50%)；III 度：明显缓解(疼痛减轻约 75%)；IV 度：完全缓解(疼痛消失)

3.4 总疼痛缓解度(**Total pain relief, TPAR**)当日各次(各时点)疼痛缓解度之和即为当天的 TPAR。

3.5 中度(2 度)以上疼痛缓解率 即疼痛缓解 2 度以上患者占全部受试者之比。

3.6 镇痛分(**Analgesic score, ANS**)系指各时点的 PID 与 PAR 之和。

3.7 总镇痛分(**Total analgesic score, TANS**)当日各时点镇痛分之总和即为当天的 TANS。

3.8 对患者用药前及用药后各日生活质量的改变情况做出评价 应用以上各项参数或部分参数，通过与对照组的统计学处理分析，可以对受试药做出有关临床镇痛效果的评价结论。

4、观察结果

4.1 镇痛效果：

受试者均于用药后的 30'(0.5h)内出现不同程度的镇痛效果，部分受试者在用药后 5'(0.08h)内即出现明显的镇痛作用，连续用药三天(30 μ g \times 6 支=180 μ g)受试者的疼痛强度均由用药前的中度以上降至 1—0 级，并于第四天停止用药后的 20—30 天内未发现病人再出现疼痛，见表 1—8。

4.2 对日常生活质量的影响：

用药前大多数受试者都因疼痛而使生活质量受到中度以上的影响，用药后大部分受试者的生活质量得到明显改善，由重度干扰缓解到中度或轻度，连续用药三天后多数受试者恢复到 0 干扰，有的受试者可以同正常人一起打麻将，去浴池洗澡，有的受试者可以长途旅行（从哈尔滨到北京）详见表 6 和典型病例。用药和停药后均未见有嗜睡和成瘾现象。

4.3 不良反应：

受试者在用药后的 10'—20' 内可发生口唇、舌头、指端和趾尖麻木，一般维持 30' 左右自行消失，勿须处理。部分用过杜冷丁注射液的受试者在初次用替曲朵辛注射液后可出现轻、中度恶心、呕吐，再次用药后即消失。部分受试者用药后出现收缩压和舒张压下降，大多数受试者的血压下降幅度在 10—15mmHg (1.33-2kpa)，不须处理可在 40'—50' 内自行恢复正常。少数受试者在呕吐时伴有心慌，持续 10'—15' 即自行消失。

5、小结

本组临床观察病例虽然不多，但按上述方法观察和判定受试者接受替曲朵辛注射液的镇痛效果证明该药与其它镇痛药相比有以下优点：

- 1、用药量小：每次用药 30 μ g，每日 2 支，连用三天共 180 μ g。
- 2、疗程短：三天一个疗程。
- 3、起效快：用药后 5'—30' 内起效。
- 4、维持时间长：连续用药三天后，可维持 20—30 天，不出现疼痛（本组受试者自 99.9.21—10.8 接受治疗至 10 月 10 日全部停止用药，直到 10 月 31 日尚未接到受试者有疼痛的报告。）
- 5、用药和停药后均无嗜睡和成瘾现象。
- 6、毒副作用小：使用治疗剂量仅有麻木感，血压轻度下降和轻度恶心、呕吐，均不须处理，可自行恢复。
- 7、对久用杜冷丁注射液产生药物依赖的受试者尚有明显的脱瘾作用。
- 8、对恶性肿瘤受试者的病情有缓解作用。

典型病例

病例一：

高 xx，男，44 岁，汉族，已婚，高中文化。

1996 年 3 月腹痛，确诊为腹后壁平滑肌瘤，手术切除。

1997 年 3 月复发手术切除病理诊断为平滑肌肉瘤。

1999 年 3 月发现肝转移，进行介入治疗。1999.8 开始因腹部胀痛难忍而使用杜冷丁注射液，现在每天需用 3 支，开始时肌注，后来直接打静脉，已用杜冷丁注射液 100 多支，现在不用杜冷丁注射液全身软弱无力、不能走路，站立时双腿打颤，全身疼痛难忍，自愿接受本项临床观察。用药前疼痛分数为 8，肌注替曲朵辛注射液 5' 后疼痛即由 8 降至 0，连续用药三天后能自己去公共浴池洗桑拿，去朋友家打麻将，至今没有任何不适和疼痛感，生活正常。

病例二：

张 xx，男，26 岁，汉族，未婚，初中文化，司机。

1999 年 3 月肝区疼去医院检查确诊为肝癌晚期。

1999 年 7 月病情加重，腹胀腹痛难忍，用去痛片、杜冷丁注射液治疗，自愿接受本项临床观察。用药前疼痛分数为 8，肌注替曲朵辛注射液后从第二天开始疼痛分数由

8 至降到 0，生活质量也随之明显提高，于停药后即和家人一起去北京做进一步诊治。

病例三：

谢 xx，女，76 岁，汉族，已婚。

1996 年结肠癌术后，98 年发现肝转移，99 年 6 月疼痛加剧难以忍受，服用强痛定。自愿接受本项临床研究，用药前疼痛分数为 6，肌注替曲朵辛注射液后 20' 降至 0，生活质量由 10 降至 6，三天后恢复正常。

病例四：

段 xx，女，46 岁，汉族，已婚，高中文化，教师。

1998 年 12 月腰痛逐渐加重，服去痛片可缓解，近半年伴左下肢疼痛且逐渐加重，先后服用去痛片，奥贝、非普拉宗、强痛定、杜冷丁、曲马多止痛，经确诊为肝癌骨转移，L₃、L₄ T₁₁ 椎体溶骨性破坏，自愿接受替曲朵辛注射液临床研究，用药前疼痛分数为 9，肌注替曲朵辛注射液 10' 降至 7，20' 降至 2，三天后停药疼痛完全消失。

病例五：

李 xx，女，72 岁，汉族，已婚，工人。

1999 年 2 月腹胀，纳差，经对症治疗无效，腹部 B 超检查提示肝癌，化疗后缓解。

1999 年 9 月腹胀、腹疼加重，服去痛片不能缓解，自愿接受本项临床观察。用药前疼痛分数 7，肌注替曲朵辛注射液 10' 后由 7 降至 0，连续用药三天后生活基本恢复正常。

病例六：

李 xx，男，36 岁，汉族，已婚，初中文化。

1999 年 8 月经黑龙江省肿瘤医院确诊为肝癌晚期，近日肝区疼痛加剧，肌注盐酸哌替啶，不能完全缓解，自愿接受本项临床观察。用药前疼痛分数为 7，肌注替曲朵辛注射液 20' 后由 7 降至 3，连续用药至 1.5 天降至 0，连续用药至第三天生活质量达到 0 干扰。

病例七：

陈 x，男，60 岁，汉族，已婚，大学文化，餐馆店主，旅居北爱尔兰。

胃粘液腺癌在北爱尔兰术后三个月复发，腹胀、腹痛日渐加重，CT 见双肺、肝和腹腔淋巴结广泛转移，自愿接受本项临床观察。用药前疼痛分数 8，肌注替曲朵辛注射液 20' 即由 8 降至 0，连续三天后生活基本恢复正常。

病例八：

石 xx，男，59 岁，壮族，已婚，初中文化，农民。

胸骨后反复灼痛一年余，吞咽困难一月余，食入即吐，经确诊为食道中段癌，术后疼痛剧烈，用杜冷丁不能缓解，自愿接受本项临床观察。用药前疼痛分数 8，肌注替曲朵辛注射液 2 支后，由 8 降至 0，三天后生活基本恢复正常。

病例九：

刘 xx，女，69 岁，汉族，已婚，高中文化，工人。

胃癌术后 3 年，近日发现左颈部淋巴结肿大，病理确诊胃癌淋巴结转移，近日疼痛加

剧，不能缓解，自愿接受本项临床观察。用药前疼痛分数 9，肌注替曲朵辛注射液后 3h，由 9 降至 2，连用三天后降至 0。

病例十：

覃 xx，女，52 岁，壮族，已婚，初中文化，农民。

直肠癌术后一年复发，会阴部肿物破溃，疼痛剧烈，头昏头痛不能讲话，自愿接受本项临床观察。用药前疼痛分数 7，肌注替曲朵辛注射液后 1h，即由 7 降至 0，连用三天后出院。

病例十一：

金 xx，男，63 岁，汉族，已婚，大学文化，电影导演。

肝癌 8 年，近半年疼痛加剧不能缓解，本人自愿接受本项临床观察。用药前疼痛分数 7，肌注替曲朵辛注射液第三天，由 7 降至 0，生活质量也随之明显提高。

表 1. 替曲朵辛治疗癌症疼痛病例表

编号	姓名	性别	年龄	病况	疼痛分类	剂量 (μg)	治疗前疼痛 指数	治疗后疼痛 指数	副作用
1	高 xx	男	44	平滑肌瘤肝转移	局部痛, 全身痛	180	8	0	麻木, 恶心, 呕吐
2	张 xx	男	26	晚期肝癌	胀痛, 肿痛	180	6	0	麻木
3	谢 xx	女	76	结肠癌肝转移	钝痛, 局部痛, 全身痛	180	6	0	麻木
4	段 xx	女	46	肝癌骨转移	刺痛	180	9	1	麻木
5	李 xx	女	72	肝癌	胀痛, 肿痛	180	7	0	麻木
6	李 xx	男	36	晚期肝癌	胀痛, 肿痛	180	7	0	麻木
7	陈 x	男	60	胃癌	局部痛, 钝痛	180	8	0	麻木, 恶心, 呕吐
8	石 xx	男	59	术后食道癌复发	局部痛, 钝痛	180	8	0	麻木
9	刘 xx	女	69	胃癌淋巴转移	局部痛, 钝痛	180	9	0	麻木
10	谭 xx	女	52	术后结肠癌复发	局部痛, 钝痛	180	7	0	麻木
11	金 xx	男	63	肝癌	局部痛, 钝痛	180	7	0	麻木

实施例 3 TTX 对大鼠和小鼠的镇痛作用

药物：替曲朵辛原料药，由南宁枫叶药业有限公司提供。批号：960510，纯度：95%。
阿斯匹林粉剂，青海制药厂生产，批号：940305 盐酸哌替啶粉剂，青海制药厂生产，
批号：930412 硫酸吗啡，青海制药厂生产，批号：940701

溶剂：生理盐水。

配制方法：用生理盐水配成所需浓度的注射液。

动物：wistar 大白鼠，昆明种小白鼠 北京医科大学实验动物部提供，符合国家一级实验动物标准。

体重：大鼠：170—230g 小鼠：18--22 g

性别：♀ ♂ 兼用

3.1 大鼠皮下和肌肉注射替曲朵辛的镇痛试验（甲醛法）

用 ♂ 大鼠，随机分组，一组为 NS 对照组，其余为给药组。本试验以吗啡作为阳性对照。试验前禁食 12 小时，饮水不限。致痛源为 2.5% 的甲醛（40% 甲醛，北京化工三厂生产，批号：930502，化学纯，用蒸馏水稀释成 2.5% 溶液作为化学致痛剂）大鼠 s.c 或 i.m 不同剂量的受试药物后分别放入 20cm×20cm×20cm 的有机玻璃观察盒内，30min 后在大鼠右后足背 s.c.2.5% 甲醛 0.05ml/只，立即观察记录 5 min 内大鼠的疼痛反应，表现为舔/咬、抽、抬右后足，并根据不同的痛反应评分，具体为舔/咬后足时间（sec）×3+抽动后足次数×2/3+抬后足时间（sec）然后将各给药组的痛反应分数与 NS 组的痛反应分数进行比较，按下式计算药物抑制痛反应分数的百分率：

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{NS 组痛反应平均分} - \text{替曲朵辛组痛反应平均分}}{\text{NS 组痛反应平均分}} \times 100\%$$

以 logit 法算出替曲朵辛在该模型上的 ID₅₀ 值。

肌肉或皮下注射替曲朵辛在大鼠甲醛模型上的镇痛强度基本相同。其镇痛 ID₅₀ 值分别为 0.82 和 0.93 μg/kg。在本模型上替曲朵辛的镇痛作用比吗啡大 3200 和 2900 倍。结果见表 2 和表 3：

表 2 替曲朵辛、吗啡对大鼠的镇痛 ID₅₀ (im)

组 别	动物数 (n)	痛反应分值 (X)	抑制率 (%)	ID ₅₀ 及 95% 可信限
NS	8	237.5		
替曲朵辛 (μg/kg)				
0.3	8	186.4	21.5	
0.6	8	132.9	44.0	
1.25	8	72.1	69.6	
2.5	8	67.3	71.7	0.82(0.66-1.0)
5.0	8	41.3	82.6	μg/kg
吗啡 (mg/kg)				
0.6	8	210.7	11.3	
1.25	8	190.7	19.7	

2.5	8	158.2	33.4	2.63(2.32-2.98)
5.0	8	46.1	80.6	mg/kg
10.0	8	13.1	94.2	

表 3 替曲朵辛、吗啡对大鼠的镇痛 ID₅₀(sc)

组 别	动物数 (n)	痛反应分值 (X)	抑制率 (%)	ID ₅₀ 及 95% 可信限
NS	20	203.6		
替曲朵辛(μg/kg)				
0.25	10	152.7	25.0	
0.50	10	116.0	43.0	
2.50	10	57.2	71.9	0.93(0.56-1.56)
5.0	10	48.5	76.2	μg/kg
10.0	10	45.9	77.5	
吗啡(mg/kg)				
2.5	10	131.2	35.6	
3.5	10	51.6	74.6	
5.0	10	30.1	85.2	2.74(2.24-3.35)
6.5	10	22.7	88.9	mg/kg
8.0	10	5.2	91.0	

3.2 小鼠皮下和肌肉注射替曲朵辛的镇痛实验(醋酸扭体法)

小鼠随机分组, 1 组为 NS 对照组, 其余为给药组, 每组 20 只。本试验以阿斯匹林和哌替啶作为阳性对照药。实验前禁食 12 小时, 饮水不限。实验以 0.6%醋酸为致痛剂(36% 醋酸, 北京化工厂生产, 批号: 940406) i. p 0.1ml/10g。NS 组 20 只小鼠先 s. c NS, 40min 后 i. p 醋酸, 5min 后开始记录 10min 以内小鼠扭体数。以小鼠出现腰部肌肉反复收缩、拱背, 臀部扭转和后肢伸展为扭体反应阳性。给药组小鼠 s. c 或 i. m 给药 45 min 后 i. p 醋酸, 观察方法同 NS 组。将给药组和 NS 组小鼠扭体数进行比较, 按下列公式计算药物抑制扭体百分率:

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{对照组扭体数} - \text{给药组扭体数}}{\text{对照组扭体数}} \times 100\%$$

用 logit 法计算半数抑制量 ID₅₀。

实验结果表明, 肌肉或皮下注射替曲朵辛在小鼠醋酸扭体模型上的镇痛强度基本相同。替曲朵辛的镇痛强度远远超过阿斯匹林和哌替啶, 分别是阿斯匹林的 65,643(im)和 74,179 倍(sc) 是哌替啶的 617 倍(sc)。结果见表 4, 5。

表 4 替曲朵辛、阿斯匹林和哌替啶对小鼠的镇痛 ID₅₀(im)

组 别	动物数 (n)	扭体次数 (n)	抑制率 (%)	ID ₅₀ 及 95% 可信限
NS	20	28.2		
替曲朵辛(μ g/kg)				
1..25	20	20.9	25.9	
2.5	20	15.7	43.9	2.80(2.37-3.26)
5.0	20	9.4	66.7	μ g/kg
10.0	20	3.2	88.7	
阿斯匹林(mg/kg)				
100	20	22.1	21.7	
200	20	14.3	43.9	183.8(164.9-202.4)
300	20	7.2	74.4	mg/kg
400	20	2.7	90.6	

表 5 替曲朵辛、阿斯匹林和哌替啶对小鼠的镇痛 ID₅₀(sc)

组 别	动物数 (n)	扭体次数 (n)	抑制率 (%)	ID ₅₀ 及 95% 可信限
NS	20	16.7		
替曲朵辛(μ g/kg)				
1.0	20	12.5	25.2	
2.5	20	8.9	46.7	2.68(2.32-3.53)
5.0	20	6.9	58.7	μ g/kg
10.0	20	2.8	82.2	
阿斯匹林(mg/kg)				
100	20	15.0	18.9	
200	20	9.96	46.2	198.8(181.7-217.5)
300	20	5.66	69.4	mg/kg
400	20	2.70	85.4	
哌替啶(mg/kg)				
1.0	20	14.2	23.2	
2.0	20	8.2	55.6	
3.0	20	6.1	67.0	1.8(1.6-2.1)
4.0	20	3.1	83.2	mg/kg
5.0	20	0.31	98.3	

3.3 小鼠皮下和肌肉注射替曲朵辛的镇痛时-效关系研究(醋酸扭体法)

用小鼠扭体法, 方法同上。测出 ID₅₀后, 用 2 倍 ID₅₀ 剂量给小鼠 i.m 或 s.c 替曲朵辛, 于给药后 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 330 分钟, 各测定一次小鼠扭体反应,

并用阿斯匹林作对照。将各时间点镇痛有效百分率绘制替曲朵辛的时效曲线。

实验结果表明：i.m 和 S.C 给替曲朵辛后均在 15min 开始起效，起效后 1 小时达高峰，镇痛作用持续约 5 小时，其镇痛作用时间明显比阿斯匹林长。见表 6，7。

表 6 替曲朵辛在小鼠扭体镇痛试验中的时-效关系(sc.)

	给药后时间(min)							
	15	30	60	120	180	240	300	330
平均扭体数	9.9±9.4	8.7±4.0	6.0±5.5	16.9±14.4	7.6±11.7	18.5±13.4	18.6±11.1	22.8±10.1
抑制百分率	64.9	69.1	78.7	40.1	72.5	34.0	34.0	19.1
P 值*	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.05	<0.05	>0.05

*与 NS 组的平均扭体数(28.2±12.4)比

表 7 阿斯匹林在小鼠扭体镇痛试验中的时-效关系(ig.)

	给药后时间(min)							
	10	20	30	40	70	100	130	
平均扭体数	11.4±9.9	10.9±10.1	1.98±0.2	4.8±1.1	6.8±1.4	11.8±2.5	11.8±9.5	
抑制百分率	38.4	41.1	89.2	74.1	65.9	37.1	36.2	
P 值*	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	>0.05	

*与 NS 组的平均扭体数(18.5±6.4)比

表 8 替曲朵辛在小鼠扭体镇痛试验中的时-效关系(im.)

	给药后时间(min)							
	15	30	60	120	180	240	300	360
平均扭体数	10.4±8.2	8.0±5.3	5.4±4.1	15.7±7.1	8.8±6.1	10.5±5.8	15.7±5.0	22.3±9.8
抑制百分率(%)	63.2	71.6	80.9	44.3	68.8	62.8	44.3	20.9
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.05	>0.05

*与NS对照组的平均扭体数(28.2±14.3，n=20)比较。

表 9 阿斯匹林在小鼠扭体镇痛试验中的时-效关系(sc)

	给药后时间(min)							
	10	20	30	45	60	90	120	150
平均扭体数	19.5±11.2	17.7±9.2	5.5±1.2	8.2±2.7	10.2±3.6	14.4±5.8	19.3±3.1	22.8±9.7
抑制百分率(%)	30.8	37.2	80.6	70.9	63.8	49.0	31.6	19.3
P 值	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	>0.05

*与NS对照组的平均扭体数(28.2 ± 14.3 , $n=20$)比较。

实施例 4 替曲朵辛的身体依赖性实验

对替曲朵辛的药物成瘾可能性在三种动物种属(昆明小鼠, Wistar 大鼠和广西猴(恒河猴的亚种))和四种动物模型上作了研究。

药物: 替取朵辛原料药粉。南宁枫叶药业有限公司提供。纯度: 86%; 盐酸吗啡, 青海制药厂生产, 批号: 940701;

溶剂: 生理盐水

配制方法: 用生理盐水(NS)配成所需浓度的溶液。

体重: 大鼠 190—230g, 小鼠 20—25g, 猴 3—6kg。

性别: 大、小鼠雌雄各半, 猴雌雄搭配。

组动物数: 小鼠 20 只, 大鼠 10 只, 猴 3—6 只。

每只接受容量: 小鼠 0.1ml/10g; 大鼠 0.2ml/100g, 猴 0.1ml/kg。

4.1 小鼠催促跳跃试验;

小鼠随机分组, 阳性对照组 sc 吗啡 20mg/kg; TTX 设置两组, 其剂量分别为 8 μ g/kg、14 μ g/kg, NS 组给等容量 NS, 以上各组均恒量给药 7 天。第 8 天早 8:30 末次给药后 2 小时用 10mg/kg M5050(s.c)催促, 记录每只小鼠的跳跃发生率和跳跃次数。

结果经单因素方差分析表明, 吗啡组出现了明显的跳跃反应, 跳跃发生率和跳跃次数与替取朵辛组和 NS 对照组比均有显著性差异 ($P < 0.05$); 而替取朵辛组与 NS 对照组比则无显著性差异 ($P > 0.05$)。这表明, 在所用剂量下, 替取朵辛对小鼠 s.c 一周恒量给药后与 NS 结果一样, 均未出现身体依赖性指症(见表 10)

表 10. 替取朵辛、吗啡和 NS 组小鼠跳跃结果比较

组 别	小鼠数 (n)	跳跃率 (%)	跳跃次数 ($\bar{X} \pm SD$)
吗啡组	20	90.0*	19.7 \pm 16.3*
替取朵辛(大)	20	10.0#	0.70 \pm 2.70#
替取朵辛(小)	20	10.0#	1.30 \pm 3.90#
NS 组	10	20.0	0.80 \pm 2.20

*与 NS 组比较 $P < 0.05$ 。

#与 NS 组比较 $P > 0.05$ 。

4.2 大鼠催促戒断试验

大鼠随机分为阳性对照组和替取朵辛给药组。给药方案: 吗啡组: sc 吗啡剂量分别为 5、10、15、20、25、30、35mg/kg 各 1 天, 每天给药 3 次; 替取朵辛设两个剂量组, 剂量分别为 1.5 μ g/kg、3.0 μ g/kg, 每天给药 3 次, 递增剂量给药 7 天, 分别达 10.5 和 15 μ g/kg。第 8 天早 8:30 末次给药后 2 小时用 2mg/kg M5050(s.c)催促, 按观察表(附 1)记录戒断反应和体重下降程度, 并评分。

结果表明：替取朵辛两个剂量组的戒断症状分和体重下降分均与 NS 组相近,都明显低于吗啡组并有非常显著性差异($P<0.01$)。这表明,替取朵辛对大鼠在所试剂量下长期给药未产生任何身体依赖性反应(见表 11)

表 11 替取朵辛、吗啡和 NS 催促戒断分值比较

组 别	组鼠数 (n)	戒断症状分 ($\bar{X} \pm SD$)	体重下降分 ($\bar{X} \pm SD$)
吗啡组	8	7.38 \pm 1.16**	10.00 \pm 2.60**
替取朵辛(大)	7	0.30 \pm 0.90	0.00 \pm 0.00
替取朵辛(小)	10	0.20 \pm 0.60	0.00 \pm 0.00
NS 组	10	0.40 \pm 1.20	0.00 \pm 0.00

**与替取朵辛组和 NS 组比 $P<0.01$ 。

4.3 大鼠自然戒断试验

大鼠催促戒断试验后继续给药 2 周,吗啡组剂量依次为 40、50、60mg/kg 各 3 天,70mg/kg 4 天,每天给药 3 次。替取朵辛剂量同前。连续给药 21 天,停药观察大鼠体重下降情况,每天称体重 3 次,至体重恢复。

从表 3 结果看,替取朵辛两个剂量组连续给药 3 周,停药后体重变化不大,各时间点体重与 NS 组比较均无显著性差异($P>0.05$),且第 48 小时的体重均比 NS 组高,替取朵辛小剂量组的体重已恢复并超过停药前。而吗啡组的体重明显下降,与 NS 组及替取朵辛组的体重比有非常显著性差异($P<0.01$)。这表明,替取朵辛在大鼠自然戒断试验中,没有产生身体依赖性指征。

表 12 替取朵辛、吗啡组体组体重变化情况比较

($\bar{X} \pm SD$, 体重下降百分率%)

组别	n	停药后时间			
		12h	30h	36h	48h
吗啡组	10	-7.82 \pm 2.57**	13.0 \pm 2.90**	-10.76 \pm 3.67	-9.37 \pm 4.13
替取朵辛(小)	10	-3.04 \pm 2.49	-0.58 \pm 1.43	-1.79 \pm 1.82	4.05 \pm 1.82
替取朵辛(大)	9	-4.83 \pm 1.80	-3.99 \pm 2.19	-4.45 \pm 3.32	-0.79 \pm 4.21
NS	10	-2.57 \pm 3.12	-4.77 \pm 5.18	-2.92 \pm 5.13	-1.17 \pm 4.04

**与替取朵辛组及 NS 组比 $P<0.01$

4.4 猴催促戒断试验

将猴分为吗啡阳性对照组、NS 阴性对照组和替取朵辛组,每天给药 3 次

(8:30,14:30,20:30)。阳性对照组 im 吗啡,以剂量递增法形成吗啡依赖模型。剂量为 3、6mg/kg 各 3 天,9、12mg/kg 各 4 天,第 3 周 15mg/kg 维持至 1 个月。替取朵辛的剂量为 1、2、3 μ g/kg,各一周,第 4 周增至 4 μ g/kg 时发现明显毒性反应(呕吐),又降至 3 μ g/kg,共给药 1 个月。第 31 天早上 8:30 末次给药 1 小时,sc 纳洛酮 1mg/kg,立即观察给药后 1 小时内猴的戒断症状及体重变化百分率,并按观察表(附件 2)评分。

结果经组间 t 检验表明,替取朵辛组和 NS 组的戒断症状分值和体重下降百分率均明显低于吗啡组($P<0.01$) 而替取朵辛组的戒断症状分值和体重下降百分率均与 NS 组非常接近,说明替取朵辛长期给药后用吗啡拮抗剂纳洛酮催促未出现吗啡样戒断症状,提示替取朵辛长期给药后不会引起身体依赖性(见表 13)

表 13 替取朵辛、吗啡和 NS 组催促戒断试验结果($\bar{X} \pm SD$)

组别	n	戒断症状分	体重下降%
吗啡组	3	61.0 \pm 2.6**	6.6 \pm 1.7**
替取朵辛组	6	2.6 \pm 4.6	0.4 \pm 0.8
NS 组	3	2.6 \pm 4.6	0.7 \pm 0.6

**与替取朵辛和 NS 组比($P<0.01$)

4.5 猴自然戒断试验

将猴分为吗啡阳性对照,NS 阴性对照组和替取朵辛组,试验步骤和给药方法同催促戒断试验。30 天后维持催促试验大剂量继续给药至 90 天,然后停止给吗啡、替取朵辛和 NS,观察停药一周内各组猴的戒断症状和体重变化情况,每天 3 次,并按观察表(附 2)评分。

从表 14、15 结果可以看出,替取朵辛在连续给药三个月后停药观察一周,未出现任何戒断症状。停药的前 3 天个别猴有时有些兴奋多动现象,但很快消失。体重非但没有减轻反而比给药期间增加。吗啡对照组则出现明显的戒断症状,说明替取朵辛在所试剂量下长期给药不会出现身体依赖性。

表 14 各组猴自然戒断期间戒断症状分值比较($\bar{X} \pm SD$)

组别	n	戒断后天数						
		1	2	3	4	5	6	7
吗啡组	4	34.8 \pm 26.4	35.3 \pm 20.5	28.3 \pm 5.4	16.3 \pm 7.5	15.3 \pm 5.7	10.3 \pm 0.5	10.5 \pm 2.5
替取朵辛组	6	0	0	0	0	0	0	0
NS 组	3	0	0	0	0	0	0	0

表 15 各组猴自然戒断期间体重变化百分率($\bar{X} \pm SD$)

		戒 断 后 天 数							
总平均 组别	n								
		1	2	3	4	5	6	7	
(X±SD)									
吗啡组	4	-4.8±0.4	-7.1±2.5	-5.4±3.4	-5.9±2.0	-6.8±2.4	-6.6±2.4	-5.9±1.4	-6.1±0.8**
替取朵辛组	3	1.6±1.4	2.9±3.7	3.8±2.9	3.1±1.8	3.7±2.7	3.5±2.8	4.1±1.6	3.2±0.8
NS 组	3	1.6±2.9	2.4±1.5	3.0±0.8	3.1±0.7	3.0±1.8	2.4±1.1	2.8±2.6	2.6±0.5

**与替取朵辛和 NS 组比 $P < 0.01$ 。

附 1

大鼠催促实验戒断症状观察表

年 月 日

鼠号	性别	戒断药	戒断前体重 (克)					
症状		条件	15'	30'	45'	60'	90'	120'
行为表现	异常姿势	湿狗样震颤(2)						
	高度激怒	触碰轻度(1)						
		靠近重度(2)						
	咬牙	间断性(0.5)						
		连续性(1)						
植物神经系统症状	流泪	(4)						
	腹泻	软便(4)						
		不成形(8)						
	流涎	轻度(1)						
		明显(2)						
戒断后体重(克)								
体重变化 (%)		<2%(0)						
		2-4%(5)						
		4-6%(10)						
		6-8%(15)						
		>8%(20)						

注:

总得分:

附 2

猴戒断症状观察表

号 日		♀♂ 时	体重 kg			最后给药时间			月
症状		时间	天			天			天
			8:30	14:30	20:30	8:30	14:30	20:30	8:30 14:30 20:30
轻 度	轻度不安,争 斗								
	蹄鸣								
	食欲减退								
	稀便								
	流涎,流涕								
	颜面潮红								
中 度	意向性震颤								
	厌食								
	肌肉僵硬								
	抽搐								
	立毛								
	抱腹								
重 度	无力躺卧								
	腹泻								
	奇异姿势								
	呕吐								
极 重	闭目侧卧								
	衰竭状态								
极 重	死亡								
状态总分									
体重(kg)									
体温(°C)									

附 3

猴戒断症状分级、评分方法

一、分级

- 1、轻度:恐惧、打哈气、流泪、颤抖、颜面潮红、出汗、啼鸣、争斗不和、食欲下降、稀便。
- 2、中度:意向性震颤、厌食、竖毛、肌肉抽搐、抱腹、腹泻、无力躺卧。
- 3、重度:极度不安、闭目侧卧、异常姿势、呕吐、面色苍白、明显肌痉挛。
- 4、极重度:衰竭状态(无表情,呼吸困难,脱水)、体重明显下降、循环衰竭、死亡。

二、评分〈级差分+症状分〉

轻度:级差分 5 分,每个症状 3 分,同一个症状一天内重复出现时减 1 分。

中度:级差分 10 分,每个症状 4 分,同一个症状一天内重复出现时减 1 分。

重度:级差分 17 分,每个症状 4 分,同一个症状一天内重复出现时减 1 分。

极重度:级差分 32 分,衰竭状态 20 分,死亡 30 分。

三、评分依据

症状等级不同,得分应有区别,同一等级中症状种类的多少,得分应有区别,但不应比级差分值大。

3 个次级症状等于高一级症状分值,如 3 个轻度症状分

$\langle 5+3 \times 3 \rangle = 1$ 个中等症状分 $\langle 10+4 \rangle$ 。

3 个中等症状分 $\langle 10+4 \times 3 \rangle = 1$ 个重度症状分 $\langle 17+5 \rangle$ 。

出现衰竭状态或死亡时,其他症状都看不到,故给的分值相当于轻、中、重症状分的总和。

实施例 5 替曲朵辛的一般药理学研究

药物：TTX 原料药，由南宁枫叶药业公司提供，纯度 91.0%，用生理盐水溶解后配成相应浓度，供腹腔注射（每 10g 鼠注射 0.1ml）氯化钠注射液：天津市氨基酸公司，批号 97091162；咖啡因：上海试剂二厂，批号 950801；安定注射液：天津市氨基酸公司人民制药厂，批号 970424；吗啡：中国药品生物制品检定所，批号 1201—9612；戊巴比妥钠：北京通县育才精细化工厂，批号 950427。

动物：昆明种小鼠体重为 17—25g，雌雄各半，每批试验动物的体重差异 \leq 5g。动物许可证号：津科动管 001 号。健康杂种犬，雌雄各半，体重 10—15kg，本院实验动物室提供，外购，饲养一周后使用。

5.1 对神经系统的影响

5.1.1. 对小鼠一般行为的影响

取体重 17—22g 的小鼠 30 只，雌雄各半，随机分组每，组 10 只小鼠，腹腔注射 TTX 剂量分别为 2.5、5、10 μ g / kg，给药后 15 分钟观察小鼠的一般行为表现、姿势、步态、有无流涎、肌颤及瞳孔等变化。

试验结果表明，小鼠一次给与 TTX2.5 μ g / kg、5 μ g / kg、10 μ g / kg 后，一般行为表现如姿势、步态均正常，无流涎、肌颤等现象，也无瞳孔变化；只有 10 μ g / kg 组小鼠给药后活动减少，闭眼。

5.1.2. 对小鼠自主活动的影响

将体重 17—22g 的小鼠雌雄各半，随机分组，每组 12 只，TTX 设 2.5、5、10 μ g / kg 三个剂量组，阳性对照药设中枢兴奋剂咖啡因 10mg / kg 组和中枢抑制剂安定 5mg / kg 组，另外一组为空白对照（生理盐水）试验时于腹腔注射药物 15 分钟后将小鼠分批放入 TDW—02 通用动物活动记录仪内，稳定 5 分钟后开始测量。每批放入小鼠 4 只，给药组与对照组交替进行试验，记录 5 分钟内各组动物自主活动数，以此比较给药组与阳性对照组及空白对照组小鼠自主活动数有无差异，用 t 检验判断差异的显著性。

试验结果表明：TTX 2.5、5 μ g / kg 小鼠的自主活动数与空白对照组比较无显著性差异（ $P>0.05$ 。）10 μ g / kg 组小鼠的自主活动数显著减少（ $P<0.01$ ）；咖啡因与各组比较均显示明显的兴奋作用；安定为中枢抑制剂，自主活动数明显少于空白对照组，而 TTX10 μ g / kg 组小鼠的自主活动数与其无显著性差异（ $P>0.05$ ）结果见表 16。

表 16.替曲朵辛对小鼠自主活动的影响

药物	剂量	动物数 (只)	自主活动数 ($\bar{X} \pm SD$)		
生理盐水	----	12	591 \pm 111		
咖 啡 因	10mg/kg	12	777 \pm 178	***	...
安 定	5.0mg/kg	12	23 \pm 203	***	'''
替曲朵辛	2.5 μ g/kg	12	547 \pm 99		''' ...
替曲朵辛	5.0 μ g/kg	12	540 \pm 118		''' ...
替曲朵辛	10 μ g/kg	12	442 \pm 98	**	'''

表示与生理盐水比较 ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

表示与咖啡因比较 ''' $P < 0.001$

表示与安定比较 ... $P < 0.001$

5.1.3. 延长戊巴比妥钠睡眠时间试验

做正式试验之前先摸清使动物 100% 入睡的戊巴比妥钠剂量, 经予试确定此剂量为 40mg / kg。

将 20—25g 小鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分组, 每组 10 只。设 TTX 三个剂量组 (2.5 μ g / kg、5 μ g / kg、10 μ g / kg) 阳性对照药安定组为 2.5mg / kg, 空白对照 (生理盐水) 组。试验时对照组腹腔注射生理盐水, 给药组按上述剂量注射被试药物, 出现峰作用前 10—15 分钟给动物按 40 mg / kg 腹腔注射戊巴比妥钠, 记录小鼠翻正反射消失的潜伏期, 观察药物对戊巴比妥钠的睡眠时间是否具有延长作用, 比较给药组与对照组之间的差异, 用 t 检验判断差异的显著性。

试验结果表明, TTX 2.5 μ g / kg、5 μ g / kg、10 μ g / kg 与空白对照组比较均无显著性差异 ($P > 0.05$) 与阳性对照药安定比较具有显著性差异 ($P < 0.001$)。说明 TTX 在所用剂量下没有中枢镇静作用, 结果见表 17。

表 17. 替曲朵辛对小鼠戊巴比妥钠睡眠时间的影响

药物	剂量	动物数 (只)	睡眠时间 ($\bar{X} \pm SD$) min
生理盐水	----	10	33.3 \pm 14.5
安 定	2.5mg/kg	10	146.2 \pm 53.0 ***
替曲朵辛	2.5 μ g/kg	10	35.1 \pm 26.2 '''
替曲朵辛	5.0 μ g/kg	10	36.3 \pm 18.7 '''
替曲朵辛	10 μ g/kg	10	26.6 \pm 22.5 '''

表示与生理盐水比较 *** $P < 0.001$

表示与安定比较 ''' $P < 0.001$

5.1.4. 肌肉松弛作用

选取 18—22g 的小鼠, 雌雄各半, 禁食 4 小时, 随机分组, 每组 10 只。设 TTX 三个剂量组 (2.5 μ g / kg、5 μ g / kg、10 μ g / kg) 阳性对照药安定 5mg / kg 组, 空白对照 (生理盐水) 组。将小鼠放在一以 50 度角置于桌面的金属网上, 任其攀附爬行, 观察 1 小时不跌落者为合格, 然后给药组腹腔注射药物, 对照组注射生理盐水, 再置网上任其爬行, 观察 50 分钟, 自行跌落者可将其再放回网上, 连续跌落三次为阳性表示该药有效。试验结果用精确概率法进行计算, 比较各组间差异的显著性。

试验结果表明, 与空白对照组比较 TTX 各剂量组均无显著性差异 ($P > 0.05$) 而与阳性对照药安定组比较, 差异非常显著 ($P < 0.001$), 说明 TTX 在所用剂量下对肌张力没有影响, 结果见表 18。

表 18.替曲朵辛肌肉松弛作用(攀网法)

药物	剂量	动物数 (只)	有效动物数 (只)
生理盐水	----	10	0
安 定	5mg/kg	10	8 ***
替曲朵辛	2.5 μ g/kg	10	0 ""
替曲朵辛	5.0 μ g/kg	10	0 ""
替曲朵辛	10 μ g/kg	10	0 ""

表示与生理盐水比较 *** $P < 0.001$

表示与安定比较 "" $P < 0.001$

5.1.5. 对麻醉犬心血管系统及呼吸系统的影响

家犬，戊巴比妥钠 30mg / kg 静脉麻醉；仰卧固定，分离股动脉，插管记录动脉血压，分离对侧股静脉用于补液，将鼻夹式呼吸换能器(TR-61ZT)夹在鼻孔内，记录呼吸频率和幅度，针状电极记录 II 导心电图，以上指标同步记录在 RM-6000 多导记录仪上。

动物术毕稳定 30 分钟以上，待各参数值稳定后，记录给药前各参数值，由臀部肌肉注射给药，对照组给予同等体积的生理盐水，分别于给药后 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180min 记录各参数值。

试验结果表明，各给药组在观察期间在各时间点的血压、心率、呼吸幅度及呼吸频率与给药前或平行对照组相比均未见明显差异($P > 0.05$) 提示替曲朵辛在所试剂量下对麻醉犬血压、心率、呼吸幅度及呼吸频率均无影响。

实施例 6 替取朵辛的毒性实验

药品：替曲朵辛原料药，纯度 99%，由南宁枫业制药有限公司提供，用时以蒸馏水稀释至所需浓度，用醋酸调至 PH4~5。

动物：Wistar 大鼠，130-170g 昆明小鼠，17—22g，雌雄各半。

6.1 小鼠急性毒性实验

动物禁食 12 小时后按体重随机分组，每组 10-20 只，雌雄各半，不同途径(iv,ip,sc,im)给药后即刻观察动物的一般情况和毒性反应及一周内死亡情况记录动物的死亡时间，对死亡动物即时进行尸检，观察肝、肾等重要器官有无出血、坏死等异常表现。若有肉眼可见变化则需进行病理检查。死亡结果用 Bliss 法统计，计算 LD50。

小鼠不同途径注射替取朵辛后的毒性反应基本相同，主要毒性反应为：不安，兴奋，四肢抽搐，尿失禁，呼吸困难、直至呼吸衰竭而死亡。iv 给药后 1-15 分钟出现死亡，其它途径给药后，一般在 20-60 分钟内死亡。死亡小鼠无性别差异。死亡动物尸检未见异常，未死动物通常在 1 小时后恢复正常。各给药途经的 LD50 值见表 19、20、21、22。

表 19 iv 替曲朵辛后小鼠死亡分布及 LD50 测定结果

剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	剂量对数 (X)	动物数 (只)	死亡动物 (只)	死亡率 (%)	机率单位 (Y)	LD50 (95%可信限)
11.8	1.070	10	10	10	7.038	
10.0	1.000	10	7	70	5.493	
8.5	0.929	10	5	50	5.000	8.3(7.5-9.2)
7.2	0.859	10	3	30	4.479	
6.1	0.788	10	1	10	3.722	

表 20 ip 替曲朵辛后小鼠死亡分布及 LD50 测定结果

剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	剂量对数 (X)	动物数 (只)	死亡动物 (只)	死亡率 (%)	机率单位 (Y)	LD50 (95%可信限)
11.8	1.070	10	9	90	6.197	
10.0	1.000	10	8	80	5.827	
8.5	0.929	10	4	40	4.747	9.0(8.2-9.8)
7.2	0.859	10	1	10	3.719	
6.1	0.788	10	0	0	2.464	

表 21 sc 替曲朵辛后小鼠死亡分布及 LD50 测定结果

剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	剂量对数 (X)	动物数 (只)	死亡动物 (只)	死亡率 (%)	机率单位 (Y)	LD50 (95%可信限)
22.9	1.360	10	10	10	7.246	
19.5	1.290	10	8	80	5.835	
16.5	1.271	10	5	50	5.000	16.2(14.7-17.8)
14.1	1.149	10	2	20	4.163	
12.0	1.079	10	1	10	3.734	

表 22 im 替曲朵辛后小鼠死亡分布及 LD50 测定结果

剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	剂量对数 (X)	动物数 (只)	死亡动物 (只)	死亡率 (%)	机率单位 (Y)	LD50 (95%可信限)
21.490	1.332	20	18	90	6.28	
19.711	1.296	20	13	65	5.39	
18.189	1.260	20	4	20	4.6	19.4(18.9-19.9)
16.734	1.224	20	0	0		

6.2 大鼠急性毒性实验

动物禁食 12 小时后按体重随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半, 不同途径(iv, im) 给药后即刻观察动物的一般情况和毒性反应及一周内死亡情况记录动物的死亡时间, 对死亡动物即时进行尸检, 观察肝、肾等重要器官有无出血、坏死等异常表现。若有肉眼可见变化则需进行病理检查。死亡结果用 Bliss 法统计, 计算 LD_{50} 。

结果显示, im. 后约 10-20', iv. 后约 1-5', 动物表现出不同程度的后肢无力, 呼吸加快, 平卧, 重者出现严重的呼吸困难(潮式呼吸) 直至呼吸衰竭致死(一般在注射后 1h 内) 个别动物在 iv. 1' 后抽搐片刻死亡。存活下来的动物呈抑制状态, 在注射约 1h 后逐渐恢复。连续观察 7 天, 未见其它异常及死亡。死亡动物大体解剖未见异常(结果见表 23、24)

表 23 大鼠一次 im. 替曲朵辛后动物死亡分布及 LD_{50} 测定结果

剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	对数剂量 (X)	动物数 (只)	死亡动物 (只)	死亡率 (%)	机率单位 (Y)	LD50 值 (95%可信限)
23.359	1.368	10	10	100		
21.490	1.332	10	9	90	6.28	18.779
19.771	1.296	10	7	70	5.52	
18.189	1.260	10	4	40	4.75	(17.993-19.599)
16.734	1.224	10	1	10	3.72	

表 24 大鼠一次 iv. 替曲朵辛后动物死亡分布及 LD_{50} 测定结果

剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	对数剂量 (X)	动物数 (只)	死亡动物 (只)	死亡率 (%)	机率单位 (Y)	LD50 值 (95%可信限)
21.671	1.336	10	9	90	6.28	
20.371	1.309	10	6	60	5.25	19.414
19.149	1.282	10	6	60	5.21	
18.000	1.255	10	1	10	3.72	(18.690-20.165)

16.920 1.228 10 1 10 3.72

6.3 恒河猴肌注替曲朵辛 28 天毒性试验

药物：替曲朵辛注射液，南宁枫叶药业有限公司提供。纯度：84%，每安瓿 30 μ g/ml。

溶剂：0.02%乙酸，灭菌注射用水：大同市惠达制药厂生产，批号：960404。

配制方法：取 15 μ g/ml 特脱定针剂 14ml，加入 2.8ml 0.02%乙酸溶液，充分混匀，配成 12.5 μ g/ml 浓度(V 组)。取浓度为 12.5 μ g/ml 特脱定溶液 6ml，加入 0.02%乙酸溶液 9ml，充分混匀，配成 5 μ g/ml 浓度(IV 组)。取浓度为 5 μ g/ml 特脱定溶液 4ml，加入 6ml 0.02%乙酸溶液，充分混匀，配成 2 μ g/ml 浓度(III 组)。

动物：恒河猴，雌雄各 10 只。动物年龄：3-4 岁，动物体重： δ 3.29 \pm 0.47kg， ♀ 3.76 \pm 0.35kg

试验分组：

组 别	剂 量		猴 有 效 治疗剂量的 倍 数	人用临床 日 剂 量 (CDD)倍数	动物数	
	μ g/kg/d	μ g/m ² /d			♀	δ
I 空白对照	0	0	0	0	2	2
II 溶剂对照	0	0	0	0	2	2
III 低剂量组	1.0	13.50	2	1	2	2
IV 中剂量组	2.5	33.75	5	2.5	2	2
V 高剂量组	6.25	84.38	12.5	6.25	2	2

注：1. 猴体表面积计算公式：

体表面积(m²)=0.118 \times 体重(kg)^{2/3}(体重按 4kg 计算)

2. 空白对照注射等体积注射用水。

给药途径：im

给药体积：0.5ml/kg 体重

给药时间：每日一次，在上午 8:30-10:30 时给药

给药期限：28 天

注射部位：两后腿股四头肌，每天轮换进行注射，注射量>2ml 时，分两个部位进行注射。

分析和测量仪器

半自动生化分析仪 (VITALAB MICRO, 荷兰)

AVL-9130 钠钾氯分析仪(美国)

多参数血细胞计数分析仪 (JT-IR, 美国)

IMPACT400 自动生化分析仪(美国)

心电图仪 (国产)

实验结果：

替曲朵辛 1.0、2.5 和 6.25 μ g/kg 3 个剂量组，分别相当于人用临床日剂量 1.0、2.5 和 6.25 倍。另设注射用水空白对照及 0.02%乙酸溶剂对照各 1 组。每组恒河猴 4 只，雌雄各半。每天 im 一次，连续 28d。结果表明，6.25 μ g/kg 组动物每次给药后均出现明显中毒症状，主要表现为呕吐，有 1/4 的动物 ALT 和 ALP 异常升高、眼睑红

肿、轻瘫等。2.5 $\mu\text{g/kg}$ 组个别动物(1/4)出现呕吐现象，AChE 活性下降 41.2%。1.0 $\mu\text{g/kg}$ 组、空白对照组和溶剂对照组动物一般生理指标观察、病理组织学检查、血液学及血液生化检查、眼科检查等均未见与给药相关的有毒理学意义的显著变化。注射替曲朵辛稀乙酸液的局部 D28 时镜下可见肌肉坏死等损伤。恢复期(D56)未见动物注射部位有肌肉损伤。在本试验条件下，替曲朵辛对恒河猴无毒剂量为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

实施例 7 替曲朵辛的局部用药毒性试验

7.1 替曲朵辛对家兔局部肌肉刺激性试验

药物：替曲朵辛注射液，南宁枫叶药业有限公司提供。纯度：84%，浓度：15 $\mu\text{g/ml}$ ，用 0.02%稀醋酸水溶液或生理盐水稀释配成所需浓度；阳性对照品为青霉素钾盐。批号：106930100，天象人生物工程有限责任公司产品。

给药剂量：替曲朵辛对家兔的给药剂量按照猴的有效剂量折算。

实验动物：新西兰大耳白兔。动物年龄：13~18 周动物体重：2.0~2.5kg。

性别和数量：，雄性，8 只，随机分成 4 组。替曲朵辛稀醋酸组，替曲朵辛生理盐水组，0.02%稀醋酸对照组，青霉素钾盐阳性对照组，每组动物为 2 只。

试验结果：

替曲朵辛稀醋酸组、替曲朵辛生理盐水组、0.02%稀醋酸(赋形剂)组和青霉素钾盐(阳性对照)组给药后未观察到家兔有松毛、精神萎靡、厌食和行动困难等症状。

替曲朵辛稀醋酸组、替曲朵辛生理盐水组、0.02%稀醋酸(赋形剂)组和青霉素钾盐(阳性对照)组给药后未观察到家兔局部皮肤有红斑、水肿等变化。替曲朵辛生理盐水组家兔肌肉注射给药 48h 后；肉眼未见注射部位股四头肌充血、坏死、硬变及其它病理变化。

替曲朵辛稀醋酸组、赋形剂组(0.02%稀醋酸)阳性对照组(青霉素钾盐)家兔肌肉注射给药 48h 后，肉眼可见注射部位股四头肌充血、坏死病理变化。替曲朵辛生理盐水组家兔肌肉注射给药 48h 后，镜下未见注射部位股四头肌有明显的组织病理学改变。替曲朵辛稀醋酸组、赋形剂组(0.02%稀醋酸)阳性对照组(青霉素钾盐)家兔肌肉注射给药 48h 后，镜下可见注射部位股四头肌有明显的肌纤维变性、坏死及周围区域的充血和出血改变。

以上结果表明，替曲朵辛稀醋酸组(0.56 $\mu\text{g/kg}$)、0.02%稀醋酸(赋形剂)组和青霉素钾盐阳性对照组(15.4 万 u/kg)对家兔均有明显的刺激反应。而替曲朵辛生理盐水组(0.56 $\mu\text{g/kg}$)对家兔肌肉未见有刺激反应。说明其刺激成分为 0.02%稀醋酸，而受试浓度的替曲朵辛本身对家兔肌肉没有刺激反应。

7.2 替曲朵辛对豚鼠全身过敏性反应

药物：替曲朵辛注射液，南宁枫叶药业有限公司提供。纯度：84%，浓度：15 $\mu\text{g/ml}$ ，用 0.02%稀醋酸水溶液或生理盐水稀释配成所需浓度；阳性对照品为牛血清白蛋白，批号：950303，上海丽珠东风生物技术有限公司产品。

给药剂量：豚鼠全身性过敏试验所用剂量是按照猴的有效剂量折算而来，为 0.95 $\mu\text{g/kg}$ 。

实验动物：豚鼠，Hartley 系。

性别和数量：24 只，雌雄各半，随机分成 3 组(替曲朵辛组，10%牛血清白蛋白阳性对照组和赋形剂组)每组动物 8 只。

动物年龄：8—12 周。动物体重：250 克—300 克。

实验方法：

按动物体重以 0.95 $\mu\text{g/kg}$ 算出每只动物所需总量，再以 0.5ml 0.2%稀醋酸总体积

算出所配制的浓度，按此浓度配制溶液。因致敏和激发周期较长，动物体重变化较大，按 $0.95\mu\text{g}/\text{kg}$ 算出每只动物的致敏药液和激发药液的浓度也有差异。

赋形剂组：为 0.02%稀醋酸水溶液。给药容量：致敏为 0.5ml，激发为 1.0ml。

10%牛血清白蛋白阳性组：取牛血清白蛋白 1g 加生理盐水至 10ml 即可。给药容量：致敏为 0.5ml，激发为 1.0ml。

致敏方法：替曲朵辛组，将配好的替曲朵辛致敏药液给予每只豚鼠腹腔注射 0.5ml，隔天一次，连续给药三次，赋形剂组和 10%牛血清白蛋白（阳性对照）组，给药方法同替曲朵辛组。然后各组动物又分 2 小组，每小组动物为 4 只。

激发方法：第一小组首次腹腔注射给药后的第 14 天，给予激发药液 1ml 由后脚掌外侧静脉注射一次。第二小组于首次给药后的第 21 天，给予激发药液同量同途径注射一次。立即观察受试动物有无搔鼻、喷嚏、竖毛、抽搐、呼吸困难、大小便失禁、休克和死亡等过敏反应。

试验结果：

替曲朵辛（ $0.95\mu\text{g}/\text{kg}$ ）组和 0.02%稀醋酸（赋形剂）组激发后，未观察到豚鼠有明显的全身过敏反应症状出现。10%牛血清白蛋白（阳性对照）组激发后几分钟，豚鼠出现程度不同的抓鼻、竖毛、不安、喷嚏以及有一只豚鼠死亡等过敏反应（见表 25）该实验结果证明：替曲朵辛 $0.95\mu\text{g}/\text{kg}$ 对豚鼠全身过敏反应为阴性，该剂量范围内使用是安全的。

表 25 替曲朵辛对豚鼠全身性过敏试验结果

组 别	动物过敏反应情况			
	*-	+	++	+++
替曲朵辛组成	**8/8	0/8	0/8	0/8
0.02%稀醋酸（赋形剂）组	8/8	0/8	0/8	0/8
10%牛血清白蛋白（阳性对照）组	0/8	4/8	3/8	1/8

注：*（-）无异常反应。

（+）抓鼻，竖毛，喷嚏，不安，呼吸急迫，轻度紫绀。

（++）竖毛，呼吸明显困难，紫绀，四肢无力，腹部贴地爬行。

（+++）死亡。

** 反应动物数/受试动物数

7.3 溶血性试验和血管刺激试验

试验材料：替曲朵辛注射液（Tetrodotoxin injection），南宁枫叶药业有限公司提供。

动物：大耳白兔

7.3.1 溶血性试验

取试管 7 支，按下表配比量依次加入 2%的家兔红细胞(RBC)悬液和生理盐水,摇匀,置于 37°C 恒温箱放置 30 分钟取出。

试管编号	1	2	3	4	5	6	7
2%RBC 悬液(ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理盐水(ml)	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.2	2.5
药液(ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.3*	-

*0.02%稀醋酸水溶液

加入不同量的药液,第6管加入与第三管等量的0.02%的醋酸水溶液作为与药液等pH对照管,第7管不加药液。

摇匀后置于37℃恒温箱,15分钟后第一次观察记录,以后每隔1小时观察记录记录1次,共观察4小时。

结果判断:

1. 如各管溶液的颜色与对照管相同即为阴性,一般以第3管即0.3ml药液,在2小时内不产生溶血作用即可供注射用。
2. 如溶液呈红色透明即为溶血。
3. 如溶液中有棕色或者红棕色沉淀,表示有红细胞聚集。如振荡试管,凝聚物可均匀分散开,或者将凝聚物取出置于载玻片上,盖上盖玻片,在盖玻片边缘滴2滴生理盐水,在显微镜下观察,凝聚的红细胞能被冲散者均可判为假凝聚,试药可供临床应用:若凝聚物不能被摇散,或者在玻片上不能冲散者则判为真凝聚,试药不能供临床应用。

如发现溶血或者红细胞凝聚现象,将药液作对倍稀释,按上述试验程序再进行试验。

试验结果:

加不同量的替曲朵辛管、溶剂对照及盐水对照管,加样后连续观察4小时,各管未见溶血现象。

7.3.2 血管刺激试验

试验分组:共分三个试验组,每组5只动物。药物组:给药剂量为1.0μg/kg。溶媒组对照:0.02%稀醋酸水溶液。盐水对照组:生理盐水。

注射容量:

均为2.0ml,耳静脉部位先消毒,而后缓慢推注,1分钟推注完。

试验期限:

每天静脉注射给药1次,连续10天。给药结束后24小时,每组活杀3只动物取注射部位的血管作病理检查,每组留下的动物继续观察2周,活杀取注射部位的血管作病理学检查。

观察记录:

每天上下午各观察记录1次,直到试验结束。观察的指标包括:注射部位的血管变化(血管颜色及手触摸的软硬度感)、全身的中毒反应、食量(初步观察进食情况,不作称量计算)和体重(给药前、给药结束和恢复期结束时称体重)等。

一般表现:

给药期间及停药后,动物给予替曲朵辛后精神状态、体重(表26)、体温(表27)、摄食未见异常。

表26 替曲朵辛静脉注射对家兔体重(kg)的影响

组别	体重($\bar{x} \pm SD$, kg)		
	药前 ^Δ	停药时 ^Δ	停药后2周*
1.0 μg/kg(TTX)	310 ± 0.38	2.88 ± 0.45	2.90 ± 0.0
0.02% (稀醋酸)	3.20 ± 0.34	3.08 ± 0.62	2.95 ± 0.21
NS (生理盐水)	3.20 ± 0.34	3.04 ± 0.45	3.10 ± 0.6

注: $\Delta n=5$, $*n=2$.

表 27 替曲朵辛静脉注射对家兔体温($^{\circ}\text{C}$)的影响

组别	体温($\bar{X} \pm \text{SD}^{\circ}\text{C}$)		
	药前 ^Δ	停药时 ^Δ	停药后 2 周 [*]
1.0 $\mu\text{g/kg}$ (TTX)	39.0 \pm 0.48	39.0 \pm 0.66	39.7 \pm 0.21
0.02% (稀醋酸)	39.0 \pm 0.36	38.9 \pm 0.68	38.1 \pm 0.21
NS (生理盐水)	39.1 \pm 0.32	39.1 \pm 0.68	39.4 \pm 0.49

注: $\Delta n=5$, $*n=2$.

给药局部血管反应:

替曲朵辛注射液耳缘静脉给予家兔,连续 10 天,注射血管未见变红、变硬及肿胀等表现。停药时及停药 2 周后,取注射部位的组织进行病理检查。结果显示注射部位静脉血管结构正常,血管内皮细胞完整,血管壁未见炎症反应。因此,在本实验条件下,替曲朵辛无溶血作用。替曲朵辛 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 静脉注射对家兔血管无明显刺激作用。

实施例 8 替曲朵辛的致突变试验

8.1 替曲朵辛对沙门氏菌的诱试验 (Ames 试验)

材料和方法:

替曲朵辛原料药, 南宁枫叶药业有限公司提供, 纯度 95.6%。

敌克松 (P-Dimethylaminobenzenediazosulfonic Acid Sodium Salt) 缩写 Dexon, 东京化成工业株式会社生产, 粉剂, 溶于水。二氨基芴 (2-Amino-fluoren) 缩写 2-AF, 粉剂, 溶于二甲基亚砷。Purum 公司产品。二羟基蒽醌 (1,8-Dihydroxyanthraquinone) 缩写 DAN, 粉剂, 溶于二甲基亚砷。Sigma 公司产品。溶剂: 0.02% 醋酸溶液。

溶液配制与保存: 用万分之一电子分析天平称取 TTX, 无菌条件下, 用溶剂配制成 1mg/ml 溶液, 4°C 存放。试验前稀释至所需浓度。

实验菌株: 选用 TA97、TA98、TA100 和 TA102 四株标准测试菌株。菌株由国内其它实验室提供。菌株在液氮冷冻下保存。

剂量设计:

替曲朵辛最高受试浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{皿}$, 最低浓度为 0.01 $\mu\text{g}/\text{皿}$, 按 10 倍依次递增。Dexon 为四菌株的直接诱变剂对照, 剂量为 50 $\mu\text{g}/\text{皿}$, 2-AF 为 TA97、TA98 和 TA100 的间接诱变剂对照, 浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{皿}$, DAN 为 TA102 菌株的间接诱变剂对照, 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 。

各项试验的描述和指标检测要求:

试验方法采用沙门氏菌诱变性试验预培养方法, 每测试点做三个平行样本, 重复试验一次, 结果取两次试验的均值。在活化与非活化两种条件下进行试验, 每次试验应平行设有空白对照溶剂对照, S_9 对照及相应的阳性对照。在确认细菌背景生长良好的条件下, 计数回变菌落数。如供试品引起的回变菌落数超过对照一倍以上, 并有剂量反应关系时, 应判供试品诱变试验阳性, 否则为阴性。

实验结果:

替曲朵辛在 0.01-100.0 (最大溶解浓度 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 浓度范围内, 在活化和非活化两种测试条件下, 均不诱发 TA97、TA98、TA100 和 TA102 四株菌突变率升高, 表明替曲朵辛在 Ames 试验中无基因诱变性。结果见表 28、29。

表 28 阳性诱变剂对沙门氏菌的诱变试验结果

浓度	回变菌落数(个/皿±SD)				
($\mu\text{g}/\text{皿}$)	S9	TA97	TA98	TA100	TA102
0.0	-	138±18	36±5	130±11	270±45
	+	116±27	40±11	154±21	263±10
Dexon(50.0)	-	1567±315	604±86	562±50	858±79
DMSO	+	126±41	30±5	129±17	242±10
2-AF(40.0)	-	97±17	26±7	97±13	
	+	1293±366	1538±335	1795±303	
DAN(100.0)	-				379±99
	+				906±69

表 29 替曲朵辛对沙门氏菌诱变试验结果

浓度	回变菌落数(个/皿±SD)				
($\mu\text{g}/\text{皿}$)	S9	TA97	TA98	TA100	TA102
0.0	-	138±18	36±5	130±11	270±45
溶剂*	-	122±17	30±8	140±12	281±53
0.01	-	126±9	37±15	132±15	273±42
0.10	-	110±16	31±9	123±25	290±34
1.0	-	114±25	32±10	131±17	301±66
10.0	-	114±15	36±4	131±18	282±63
100.0	-	126±15	30±8	139±11	292±55
0.0	+	116±27	40±11	154±21	263±10
溶剂*	+	106±19	38±13	147±15	277±28
0.01	+	142±12	46±11	142±18	280±25
0.10	+	114±24	44±19	139±17	266±30
1.0	+	110±24	42±13	130±17	299±51

10.0	+	108±20	43±8	149±14	276±33
100.0	+	119±37	44±8	127±16	273±28

*0.02%稀醋酸

8.2 替曲朵辛对 CHL 细胞染色体畸变试验

材料和方法：

替曲朵辛原料药，南宁枫叶药业有限公司提供，纯度 95.6%。

实验细胞：中国仓鼠肺细胞（CHL）经鉴定细胞核型稳定，无支原体污染。

剂量设计：

高剂量为 50% 细胞生长抑制浓度，由于该药毒性大，本试验 IC₅₀ 剂量选择 120.0、60.0、30.0、15.0、7.5 μ g/ml，试验结果替曲朵辛 IC₅₀ 未测出，因此，本试验以替曲朵辛最大溶解度作为试验最高剂量，依次递减，具体剂量见表 1、2。

对照品：空白（蒸馏水）、溶剂（0.02%醋酸）、S9 混合液（0.5ml）及阳性对照直接诱变剂丝裂霉素 C（MMC）（0.25 μ g/ml），间接诱变剂环磷酰胺（CP）（20 μ g/ml）。

代谢活化：为弥补传代培养细胞没有代谢活化系统，用多氯联苯诱导大鼠肝微粒体酶（S9）进行体外代谢活化试验。

药物作用时间：在无代谢活化条件下，药物与细胞作用 24 及 48h 收获细胞。有代谢活化条件下，因（S9）具有一定毒性，药物、S9 混合物与细胞作用 6h，洗涤、换液，于 24 及 48h 收获细胞。标本制作：药物与细胞作用 24 及 48h 收获细胞，制做标本。

方法：将 3×10^4 个 CHL 细胞接种于 25ml 培养瓶中（pH7.0）37℃，5% 二氧化碳箱培养 72h 后，加入不同浓度的替曲朵辛（以终浓度计算剂量）S9 用量为 0.5ml，分别于 24 或 48h 收获细胞。收获细胞前 4h 加入秋水仙素，终止细胞分裂。经低渗、固定、制作标本、染色等。

镜检：选择分散良好的中期相，每一试验剂量标本，在油镜下分析 100 个中期分裂相。观察染色单体型、染色体型及多倍体等变化，不计裂隙。以百分率表示畸变率。

结果判定：

CHL 细胞结果判定：

畸变率 < 5%	阴性（—）
畸变率 > 5%	可疑（±）
畸变率 > 10%	阳性（+）
畸变率 > 20%	阳性（++）
畸变率 > 50%	阳性（+++）

如果某一测试点呈现可重复的并有统计学意义的增加（ χ^2 ）符合上述一条即可判为阳性。

实验结果：

非代谢活化条件下替曲朵辛对 CHL 细胞染色体畸变作用结果见表 30。

表 30 非代谢活化条件下替曲朵辛对 CHL 细胞染色体畸变作用观察

被试物 （ μ g/ml）	细胞收获 时间（h）	观察细胞数 （个）	染色体畸变率 （%）
空白对照	24	100	0
溶剂对照	24	100	3

替曲朵辛	5.0	24	100	0
	10.0	24	100	0
	20.0	24	100	2
丝裂霉素 C	0.25	24	100	72**
空白对照		48	100	0
溶剂对照		48	100	2
替曲朵辛	5.0	48	100	1
	10.0	48	100	2
	20.0	48	100	1
丝裂霉素 C	0.25	48	100	99**

**P<0.01 与溶剂对照组比较

结果表明, 实验 24 及 48h, 空白对照染色体畸变率均为 0%, 溶剂对照染色体畸变率分别为 3 和 2%, 替曲朵辛在 5.0—20.0 μ g/ml 浓度范围内染色体畸变率在 0—2% 之间, 染色体为结构畸变。阳性药物对照丝裂霉素 C 染色体畸变率分别为 72 和 99% (P<0.01)

代谢活化条件下替曲朵辛对 CHL 细胞染色体畸变作用见表 31。

表 31 代谢活化条件下替曲朵辛对 CHL 细胞染色体畸变作用观察

被试物 (μ g/ml)	S ₉ 混合液 (ml)	细胞收获 时间(h)	观察细胞数 (个)	染色体畸变率 (%)
空白对照	-	24	100	2
溶剂对照	-	24	100	1
溶剂对照	0.5	24	100	1
S ₉ 对照	0.5	24	100	1
替曲朵辛 5.0	0.5	24	100	0
10.0	0.5	24	100	3
20.0	0.5	24	100	0
环磷酰胺 20.0	-	24	100	0
20.0	0.5	24	100	50**
空白对照	-	48	100	2
溶剂对照	-	48	100	2
溶剂对照	0.5	48	100	3
S ₉ 对照	0.5	48	100	0
替曲朵辛 5.0	0.5	48	100	1
10.0	0.5	48	100	1
20.0	0.5	48	100	1
环磷酰胺 20.0	-	48	100	3
20.0	0.5	48	100	42**

** P<0.01 与 S₉ 对照组比较

结果表明, 实验 24 及 48h, 空白对照染色体畸变率均为 2%, 溶剂对照染色体畸变率分别为 1% 和 2%, 溶剂加 S₉ 对照染色体畸变率分别为 1% 和 3%, S₉ 对照染色体畸变率为 1% 和 0%, 替曲朵辛在 5.0—20.0 μ g/ml 浓度范围内染色体畸变率在 0%—3% 之间, 染色体为结构性畸变。阳性药物对照环磷酰胺染色体畸变率分别为 50% 和 42% (P<0.01) 而非代谢活化条件下环磷酰胺染色体畸变率为 0% 和 3%。

以上结果表明, 在非代谢活化条件下, 空白对照, 溶剂对照, 替曲朵辛 5.0—20.0 μ g/ml 浓度范围内, 染色体畸变率均在正常范围, 阳性对照丝裂霉素 C 染色体畸变率显著增高。在代谢活化条件下, 空白对照, 溶剂对照, 溶剂加 S₉ 对照, S₉ 对照, 替曲朵辛在 5.0

—20.0 μ g/ml 浓度范围内染色体畸变率也均在正常范围，阳性对照环磷酰胺染色体畸变率则显著增高。同时，环磷酰胺若无代谢活化系统存在染色体畸变率则正常。以上结果表明本试验系统可靠。因此，替曲朵辛在 5.0—20.0 μ g/ml 浓度范围内未见诱发染色体畸变率明显增高。

8.3 替曲朵辛小鼠髓细胞微核试验

材料与amp;方法

替曲朵辛注射液，南宁枫叶药业有限公司提供，纯度 84%。

实验动物：小白鼠，AMS 系，年龄：60—70 天，雄性每组 6 只。体重：18—24g。

剂量设计

替曲朵辛给药剂量设计

剂量 (μ g/kg)	约相当 LD50 倍数
10	1/2~1
5	1/4~1/2
2.5	1/8~1/4

试验方法：

10 μ g/kg 给药后分别于 12、24、36、48、72h 取材，观察不同时间点小鼠微核率是否有变化。然后确定取材和时间。同时设溶剂对照、阳性对照（环磷酰胺 60mg/kg）组，均为给药后 24 小时取材观察。

给药途径和次数：

肌肉注射（im）两次给药，首次给药后 20 小时第二次给药，首次给药后 24h 处死动物取材。给药体积为 0.03ml/10g 体重。

实验结果：

替曲朵辛 10 μ g/kg 组给药后 12，24，36，48 及 72h 微核细胞率见表 1。各组微核率均在正常范围，根据上述结果，选定处死动物取材时间为首次给药后 24h。

表 32. 替曲朵辛（10 μ g/kg）给药小鼠不同时间微核率

时间 (小时)	多染红细胞数 (个)	微核细胞数 (个)	微核细胞率(%) ($\bar{x} \pm SD$)
12	6000	22	3.7 \pm 2.2
24	6000	8	1.3 \pm 1.0
36	6000	18	3.0 \pm 1.1
48	6000	16	3.0 \pm 1.3
72	6000	24	4.0 \pm 2.5
溶剂 24	6000	13	2.2 \pm 0.8

替曲朵辛 10,5,2.5 μ g/kg 三个剂量组诱导给药后取材观察，其结果见表 33。10 μ g/kg

组的微核率为 4.3%，经统计学检测，与溶剂对照组比较差异比较显著（ $P<0.05$ ）其它各剂量组微核率均在正常范围，阳性对照组与溶剂对照组比较，经统计学检测差异非常显著（ $P<0.01$ ）

表 33. 替曲朵辛不同剂量给药微核率

剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	多染红细胞数 (个)	微核细胞数 (个)	微核细胞率(%) ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
10	6000	26	$4.3 \pm 1.6^*$
5	6000	15	2.5 ± 1.5
2.5	6000	13	2.2 ± 1.3
溶剂	6000	13	2.2 ± 0.8
CP($60 \mu\text{g/kg}$)	6000	279	$46.5 \pm 12.8^{**}$

● 与溶剂对照组比较 $P<0.05$

**与溶剂对照组比较 $P<0.01$

以上结果表明， $10\mu\text{g/kg}$ （相当于 $1/2\text{LD}_{50}$ ）组经肌肉注射诱导给药后，微核率略有升高，经统计学检测，与溶剂对照组比较差异比较显著（ $P<0.05$ ）但实际意义不大。其它各剂量组微核率均在正常范围。

实施例9 替曲朵辛的生殖毒性试验

材料与方法：

替曲朵辛注射液，南宁枫叶药业有限公司提供，纯度 84%。

对照品：溶剂对照，0.02%醋酸溶液；空白对照：注射用水；阳性对照：环磷酰胺，均为医用标准。

动物：上海种小鼠，雌鼠250只；雄鼠80只。动物年龄：80-100天，健康性成熟未生育受精小鼠，体重：25-35克左右（♀）30-40克左右（♂）

剂量设计：TTX 给药剂量分别为2.5、5.0和 $10.0\mu\text{g/kg}$ 。阳性对照药环磷酰胺给药剂量为 20mg/kg 。给药小鼠每天称一次体重，根据体重变化，调整给药量。

剂距：剂距以等比排列，相邻组间相差2倍。

每只动物的接收容量 $V/10\text{g体重}$ 所有给药组及对照组动物给药容量为 $0.03\text{ml}/10\text{g}$ 体重。

给药期：雄性动物不给药，雌性动物连续给药期：从妊娠第6天至妊娠第15天连续给药10天，每天一次，肌肉注射。环磷酰胺在小鼠妊娠第11天时单次肌肉注射。

给药途径：临床给药途径，肌肉注射。

试验方法：

分别于妊娠d0、6、9、12、15和18称母鼠体重，比较各组体重变化。于妊娠d18用颈椎脱臼法处死母鼠，剖腹观察母鼠内脏器官及妊娠情况。对所有活胎鼠进行外观畸形检查。取半数活胎鼠用Bouin氏液固定三天后做徒手切片检查内脏，另半数用95%酒精固定茜素红染色做骨骼标本检查。

胎鼠观察指标：活胎数、死胎数、吸收胎数、总着床数、胎鼠身长、尾长、体重、有无外观、内脏及骨骼畸形、上枕骨骨化程度等。

实验数据采用的统计分析方法：各组母鼠平均体重，胎鼠体重、身长、尾长，用t检验

检查有无显著性差别，活胎率、死胎率、畸形率用 χ^2 检验。

实验结果：

替曲朵辛对母鼠的影响：临床症状和死亡：给药期间孕鼠一般状况良好，给药后笼旁观察未见明显异常症状和体征。

替曲朵辛2.5、5.0和10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个剂量组妊娠d12母鼠体重，与溶剂对照组和注射用水对照组相比无明显差别。妊娠d18替曲朵辛10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组母鼠体重有下降趋势，与注射用水对照组相比， $P<0.05$ ，差别显著。该高剂量组母鼠体重增重下降至 $0.3\pm 3.4\text{g}$ ，与注射用水组 $3.2\pm 2.1\text{g}$ 相比较， $P<0.01$ ，差别非常显著。溶剂对照组妊娠d18天母鼠增重也有下降趋势，与注射用水对照组相比， $P<0.05$ ，有显著性差别。环磷酰胺阳性对照组母体增重 $4.9\pm 1.8\text{g}$ 与溶剂对照组 $1.5\pm 3.1\text{g}$ 和注射用水组 $3.2\pm 2.1\text{g}$ 比， P 均 <0.01 ，差别显著。阳性对照组母鼠体重增加，可能与胎仔发育不良有关。

替曲朵辛给药三个剂量组对活胎率、死胎率及胚胎早期吸收率与溶剂对照组和注射用水对照组相比，均无显著性差别， $P>0.05$ ，阳性对照组环磷酰胺对上述指标也无明显影响。说明替曲朵辛各给药组及环磷酰胺20mg/kg于妊娠d11单次肌注均无胎毒作用。

替曲朵辛对胎鼠生长发育未见明显影响。三个给药组胎鼠的身长、尾长和体重测量结果与溶剂对照组和注射用水对照组相比均无显著性差别（ $P>0.05$ ）而环磷酰胺组胎鼠形体短小，胎鼠身长、尾长与体重与二个阴性对照组比较 $P<0.01$ ，差别非常显著。

替曲朵辛对胎鼠骨骼系统发育无明显影响。替曲朵辛三个给药组上枕骨骨化程度均是0级和1级骨化，与溶剂对照组和注射用水对照组之间无显著性差别。而环磷酰胺阳性对照组上枕骨III级骨化占6.4%，IV级骨化占89.6%与溶剂对照和注射用水对照组0%相比较， $P<0.05$ 和0.01，差别显著和非常显著。

对替曲朵辛三个剂量组的胎鼠进行外观畸形检查，未见替曲朵辛的致外观畸形作用。溶剂对照、注射用水对照组胎鼠也未发现外观畸形。而阳性对照组环磷酰胺给药胎鼠受检查胎鼠258个，248个胎鼠出现外观畸形，畸形率达96.1%，主要表现为形体短小、露脑、短尾、缺尾、短肢畸形等。

对替曲朵辛2.5、5.0和10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 给药组的89、146和106个胎鼠进行内脏检查，未发现替曲朵辛致内脏畸形作用。二个阴性对照组也未发现内脏畸形，而环磷酰胺给药组126个受检胎鼠108个出现内脏畸形主要表现为腭裂、脑缺失等，畸形率为87.5%。

替曲朵辛三个剂量组未发现骨骼畸形，而环磷酰胺阳性对照组则出现严重的骨骼畸形，主要表现为颅骨缺失、腰椎融合、无肋、无胸骨等，骨骼总畸形率为100%，与溶剂对照组和注射用水对照组相比较， $P<0.01$ ，差别均非常显著。

替曲朵辛2.5、5.0和10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个给药组均出现少肋等骨骼变异，变异率为2.1、3.4和2.8%，与溶剂对照组和注射用水对照组少肋骨骼变异率2.0和1.4%相比较，无显著性差别。

结论：

环磷酰胺阳性对照组引起胎鼠明显的外观、内脏和骨骼畸形，表明选用上海种小鼠为试验模型，对致畸剂反应敏感。溶剂对照组和注射用水对照组对受孕率、活胎、死胎及早期吸收胎率，胚胎生长发育、畸形率等均在正常范围，证明本次试验结果是可靠的。

替曲朵辛三个给药组，尤其是剂量高达10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （相当于1/2小鼠肌注LD₅₀）母鼠出现体重及体重增重下降等轻度毒性反应的情况下，对小鼠也未发现胚胎毒性及胎鼠外观、内脏和骨骼畸形，提示在本试验选用的给药时间和给药剂量下，对上海种小鼠无胚胎毒性和致畸胎作用。

前述描述和具体实例只是为了揭示本发明的最佳实现方式以及原则，这是应该可以理解。在相关领域的专业人士有能力对本发明进行修正和增加但不会脱离本发明的精神和范围 - 大家可以理解这正是此申请所提出的权利要求项所要加以限制的。

说明书摘要

本发明为哺乳动物的疼痛提供了一种新的经全身给药的镇痛方法。本方法包括向所述的哺乳动物，重复全身给予有效剂量的纯度为 96%以上的河豚毒素或蛤蚌毒素，从而缓解疼痛。